

DERWENT-ACC-NO: 1980-24651C

DERWENT-WEEK: 198014

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Human parathyroid hormone determin. -  
using enzyme  
labelled cpd. and antibody, with  
specified polypeptide as  
the hormone analogue

PRIORITY-DATA: 1978JP-0100155 (August 16, 1978)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PAGES	PUB-DATE	
LANGUAGE		MAIN-IPC	
JP 55026477 A		February 25, 1980	N/A
000	N/A		
JP 86002186 B		January 23, 1986	N/A
000	N/A		

INT-CL (IPC): A61K039/00, C12Q001/00 , G01N033/54

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 55026477A

BASIC-ABSTRACT:

A method of determining h-PTH which comprises using h-PTH-enzyme labelled cpd. (1-34h-PTH-enzyme labelled cpd.) and h-PTH antibody (1-34h-PTH antibody), the h-PTH used as 1-34 h-PTH being a polypeptide of the formula,  
Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu  
S-  
er-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-  
n-Phe-NH2  
(I).

The method using 1-34 h-PTH (I)- enzyme (e.g. beta-galactosidase) labelled cpd. and 1-34h-PTH (I) antibody exhibits good correlationship to

h-PTH having  
biological activity, and exhibits good results for the  
examination of primary  
hyperthyroidism or secondary hyperthyroidism.

For obtd. h-PTH-enzyme labelled cpd., 1-34 h-PTH (I) is  
joined with enzyme by  
polyfunctional crosslinking binder such as water-soluble  
carbodiimide, cyanuric  
chloride, etc.

----- KWIC -----

Derwent Accession Number - NRAN (1):

1980-24651C

Title - TIX (1):

Human parathyroid hormone determn. - using enzyme  
labelled cpd. and  
antibody, with specified polypeptide as the hormone  
analogue

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55-26477

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 33/54

識別記号

庁内整理番号  
6656-2G

⑭ 公開 昭和55年(1980)2月25日

発明の数 2  
審査請求 未請求

(全 9 頁)

⑮ h-PTH測定法およびその測定用キット

⑯ 発明者 中川信明

静岡県田方郡大仁町三福687

⑰ 特 願 昭53-100155

⑱ 出 願 人 東洋醸造株式会社

⑲ 出 願 昭53(1978)8月16日

静岡県田方郡大仁町三福632-1

明 細 書

1. 発明の名称

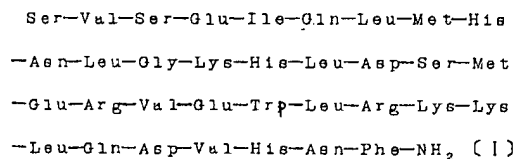
h-PTH測定法およびその測定用キット

2. 特許請求の範囲

(1) ヒトパラチロイドホルモン (h-PTH) 測定において、h-PTH-酵素標識化合物、h-PTH抗体を用いることを特徴とするh-PTH測定法。

(2) h-PTHが1-34 h-PTHであり、h-PTH-酵素標識化合物が1-34 h-PTH-酵素標識化合物であり、h-PTH抗体が1-34 h-PTH抗体である特許請求の範囲第1項記載のh-PTH測定法。

(3) 1-34 h-PTHとして使用されるh-PTHが下記一般式(1)

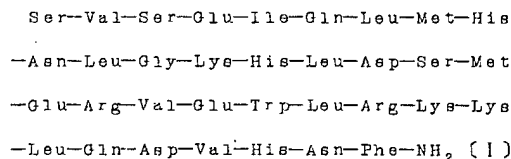


で表わされるポリペプチドである特許請求の範囲

第1項または第2項記載のh-PTH測定法。

(4) h-PTH-酵素標識化合物とh-PTH抗体を用いてなるh-PTH測定用キット。

(5) h-PTH-酵素標識化合物およびh-PTH抗体におけるh-PTHが下記一般式(1)



で表わされるポリペプチドである特許請求の範囲第4項記載のh-PTH測定用キット。

(6) h-PTH測定が原発性甲状腺機能亢進症または、続発性甲状腺機能亢進症の診断測定である特許請求の範囲第4項または第5項記載のh-PTH測定用キット。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、h-PTH (Human Parathyroid hormone) -酵素標識化合物を用いるh-PTH測定用およびその測定用キットに関する。

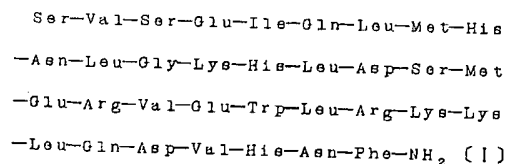
従来より、1-84 h-PTHに係るそのフラ

グメントとしては、 $1-24\text{-PTH}$ 、 $1-34\text{-PTH}$ 、 $1-44\text{-PTH}$ 、 $1-84\text{-PTH}$ 、 $25-34\text{-PTH}$ 、 $1-8-24\text{-PTH}$ 、 $1-34\text{-PTH}$ などの種々の $\text{NH}_2$ -末端 $\text{h-PTH}$ や、その他 $\text{COOH}$ -末端 $\text{h-PTH}$ が分離され、また合成されているが、このうち $1-34\text{-PTH}$ が生物活性を有するフラグメントである事が知られている。 $\text{h-PTH}$ の測定法としては、 $1-84\text{-PTH}$ が極めて不安定であり、生体内においても急速に分離されるもので、従来は $1-84\text{-PTH}$ の分解生物たる安定な $\text{COOH}$ -末端 $\text{h-PTH}$ をその安定性を利して測定していたものであつたが、近年 $\text{NH}_2$ -末端 $\text{h-PTH}$ をラジオイミュノアッセイにて測定することが報告されている。しかしこのラジオイミュノアッセイによる測定に関しては、 $\text{NH}_2$ -末端 $\text{h-PTH}$ 自体が生体内において不安定であり、早く分解されるもので、この不安定な $\text{NH}_2$ -末端 $\text{h-PTH}$ にラジオアイソトープをその標識物質として用いるため、ラジオアイソトープによつて標識

## - 3 -

本発明は上記の知見に基いて完成されたもので、 $\text{h-PTH}$ 測定において、 $\text{h-PTH}$ -酵素標識化合物、 $\text{h-PTH}$ 抗体を用いることを特徴とする $\text{h-PTH}$ 測定法、および $\text{h-PTH}$ -酵素標識化合物と $\text{h-PTH}$ 抗体を用いてなる $\text{h-PTH}$ 測定用キットであり、その目的は有用な $\text{h-PTH}$ 活断測定法およびその測定用キットを提供するものである。

まず、本発明に用いられる $\text{h-PTH}$ -酵素標識化合物において、その $\text{h-PTH}$ としては下記一般式〔I〕

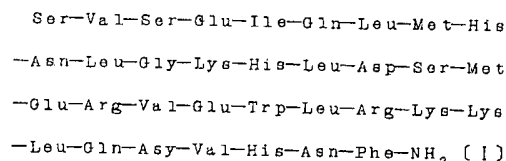


で表わされる $\text{NH}_2$ -末端 $1-34\text{-PTH}$ （以下、 $1-34\text{-PTH}$ 〔I〕と称す）が挙げられ、この $\text{h-PTH}$ としては公知のペプチド合成手段を用いて製造されたものであつてもよく、また市販品を用いたものであつてもよい。また標識

## - 5 -

された $\text{NH}_2$ -末端 $\text{h-PTH}$ は著しく不安定であり、標識時にすでに<sup>相</sup>標識の免疫活性は失活しており、かつ標識後もその免疫活性はそのラジオアイソトープの崩壊作用により急速に失活していくものであつて、良好な $\text{h-PTH}$ 測定法ではなかつた。

本発明者らは、 $\text{h-PTH}$ 測定について種々研究した結果、下記一般式〔I〕



で表わされる $\text{NH}_2$ -末端 $1-34\text{-PTH}$ を用いて、その酵素標識化合物、およびその抗体を用いることにより、免疫活性において安定かつ良好なものを得たものであり、さらにこれらを用いることにより良好に $\text{h-PTH}$ を測定し得ることを見出し、さらにこの測定において原発性甲状腺機能亢進症または続発性甲状腺機能亢進症の診断に使用し得ることを見出した。

## - 4 -

として用いられる酵素としては、公知の酵素免疫測定（Enzyme-immunoassay）として用いられる酵素が使用でき、また例えばベルオキシダーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼなどの酸化還元酵素、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの加水分解酵素などが好ましい。

さらに、この $1-34\text{-PTH}$ 〔I〕と酵素<sup>標識</sup>とを結合せしめて目的たる $\text{h-PTH}$ -酵素<sup>標識</sup>化合物を得<sup>結合せしめる</sup>のであるが、両者を結合せしめるに当つては、多官能性架橋結合剤が用いられるもので、例えば水溶性カルボジイミド、シアヌリククロライド、 $p$ ・ $p'$ -ジフルオロ- $m$ ・ $m'$ -ジエトロフェニルスルホン、<sup>グ</sup>グルタルアルデヒド、 $N$ ・ $N$ - $O$ -フェニル<sup>レ</sup>ンジマレイミド、アジリルカルボキシリク・アシッド誘導体、 $m$ -マレイミドベンゾール、 $N$ -ヒドロキシスクシンイミドエステル、 $\omega$ -アミノ酸誘導体、マレイミド置換-脂肪酸・スクシンイミドエステル誘導体、 $\gamma$ -(ベンゾチアゾール-2'-イルジチオ)脂肪酸

## - 6 -

誘導体、3-（ピリジール-N-オキサイド-2'-イルジチオ）脂肪酸誘導体などが挙げられ、また上記のアジリールカルボキシリク・アシッド誘導体としては特願昭52-125502号、特願昭52-132714号に記載の如くの化合物が挙げられ、また3-（ベンゾチアゾール-2'-イルジチオ）脂肪酸誘導体、3-（ピリジール-N-オキサイド-2'-イルジチオ）脂肪酸誘導体としては特願昭53-35900号に記載の如くの化合物が挙げられ、またそれらの架橋結合剤の使用における条件も、上記出願明細書に記載の抗原、抗体の代りに本発明のノ-34h-PTH(1)を用いればよいものであり、例えば、3-（ベンゾチアゾール-2'-イルジチオ）脂肪酸誘導体、3-（ピリジール-N-オキサイド-2'-イルジチオ）脂肪酸誘導体は、そのカルボキシル基を後述する通常の方法にて反応性誘導体となし、これを水または水とアセトン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミドなどとの混合溶媒などの水性媒体中にてノ-34h-PTH(1)と反応せしめ

- 7 -

ステル、例えばシアノメチルエステル、チオフェニルエステル、p-ニトロチオフェニルエステル、p-メタンスルホンフェニルエステル、チオジルエステル、p-ニトロフェニルエステル、2,4-ジニトロフェニルエステル、2,4,5-トリクロロフェニルエステル、2,4,6-トリクロロフェニルエステル、ペンタクロロフェニルエステル、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル、N-ヒドロキシフタル酸イミドエステル、8-ヒドロキシキノリンエステル、N-ヒドロキシピペリジンエステルなどであり、さらに必要に応じてNN'-ジイソプロピルカルボジイミド、NN'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、N-エチル-N'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド、NN'-カルボニルビスイミダゾール、イソオキサゾリウム塩、ジフェニルリン酸アミド、ジエチルリン酸アミドなどの縮合剤を使用してそのカルボキシル基の活性エステルへの変換を行なわせしめる。さらに上述の架橋結合の反応においては媒体を使用するのであるが、この媒体は不活性溶媒であれば

- 9 -

、次いでこれを必要に応じて精製した後、チオール基を有する酵素例えばβ-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ウレアーゼを水性媒体下pH 7~8付近の条件下S-S交換反応せしめてノ-34h-PTH(1)と酵素とを架橋結合して目的物たるh-PTH-酵素標識化合物とすればよいものである。さらにこの架橋結合の反応に際しては、一般に反応に関与しない遊離の基は通常の、トリフルオロ酢酸やフッ化水素を用いる酸加水分解やパラジウム-炭素を用いる還元分解により容易に除去し得る保護基にて保護せしめればよく、例えばメチル基、エチル基、ベンジル基、トリチル基、トシル基、ベンジロキシカルボニル基、2,2,2-トリフルオロノ-tert-ブチロキシカルボニルアミノエチル基などの保護基が挙げられ、また反応に関与するカルボキシル基は酸アシッド、酸イミダゾリド、酸ハログネイト、活性エステル化などのカルボキシル基の反応性誘導体に形成せしめればよく、この活性エステルにおいては通常のペプチド合成において使用される活性エ

- 8 -

よく、例えば水、酸性水溶液、塩基性水溶液、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジオキサン、ジメチルスルホキシド、酢酸エチル、ベンゼン、トルエンなどが単独または混合して選択使用され、また反応温度は室温下が好ましく、これらの使用比率としては目的とするh-PTH-酵素標識化合物に照し合せて必要なモル比にて用いればよく、例えばβ-ガラクトシダーゼ/モルに対しノ-34h-PTH(1)/モルを結合せしめるものを目的とすればまずノ-34h-PTH(1)/モルに対し架橋結合剤/2モルを加え、また直ちに、また反応後にβ-ガラクトシダーゼ/モルを加えて反応せしめればよく、なお反応に際して2段階以上の反応を行なわせしめるときは、必要に応じて濾過し、回収、洗浄し、適宜選択した媒体を用いて反応を進行せしめればよく、さらにこれらの反応によつて得られたβ-ガラクトシダーゼによつて標識されたh-PTH-β-ガラクトシダーゼ化合物を洗浄し、

- 10 -

カラムクロマトグラフィー、膜濾過、ゲル濾過などの精製手段を用いて精製してもよい。さらにまたこの酵素としての $\beta$ -ガラクトンダーゼはこれに何んら限定されるものではなく、上述の例は一例であつて、本発明の対象となる酵素は種々の酵素が挙げられるもので、かつ酵素中のカルボキシル基、チオール基、水酸基、アミノ基<sup>（カルボキシル基）</sup>をその架橋結合において利用すればよいものである。

また、本発明に用いられるh-P T H抗体としては、ノ-34h-P T H( I )を用いてなる公知の抗体産生、採取手段を用いればよく、例えばノ-34h-P T H( I )を家兎、馬、牛、羊、山羊などに、アジュバント（例えば Freund's complete Adjuvant）とともに皮下注射して、このノ-34h-P T H( I )に<sup>（抗原）</sup>反応するh-P T H抗体を産生せしめ、次いでこれより採血し、3000 rpm、15分間遠心分離してh-P T H抗体たる免疫グロブリンを有する血清を得、さらにこれを必要に応じて公知の手段にて非動化し、約-20℃程度にて保存する。またこの抗体を固

- 11 -

くの公知のカルボキシル基の反応性誘導体の手段を用いて反応性誘導体となすか、グルタルアルデヒドにて処理して活性化し、これに得られた第二抗体を、例えば5℃、10~20時間pH7.4のリン酸緩衝液にて反応せしめて担体のカルボキシル基またはアルデヒド基と第二抗体のアミノ基とによつて結合せしめ、精製し次いでこれにh-P T H抗体を加えて5℃、約20時間免疫反応して第二抗体とh-P T H抗体とを結合せしめればよく、またこのようにして得られたh-P T H抗体はその第二抗体と免疫反応によつて結合しているためh-P T H抗体のh-P T Hに対する免疫活性は何んら劣化せず、著しく正確な免疫活性を有しているものである。

次いで、本発明を実施するに当り、このh-P T H抗体を、定量すべきh-P T Hおよびノ-34h-P T H( I )-酵素標識化合物と任意時間水性媒体、例えばpH6.5~8、好ましくは7~7.4程度の緩衝液にて任意時間反応せしめて抗体に結合したノ-34h-P T H( I )-酵素標識

- 13 -

定化してもよく、固定化するに当つては、セルロース、アミノ化セルロース、アガロース、デキストリン、デキストランなどのポリサッカライドまたはそれらのエピクロロヒドリン、ジクロロヒドリン、1,2-3,4-ジエポキシブタンなどにて処理した水不溶性担体、スチレン、アクリロニトリル、アクリル酸、メタアクリル酸、アクリル酸エステル、メタアクリル酸エステル、アクリルアミド、クロトン酸、マレイン酸、塩化ビニル、酢酸ビニルなどの重合体または共重合体、イオン交換樹脂、シリコーン樹脂、ガラス、変性ゼラチン、コーゲンイミデート化、アミノ化されたポリアクリロニトリル、アミノ化されたナイロンなどの水不溶性担体を用いて吸着または水溶性カルボジイミド<sup>（グルタルアルデヒド）</sup>、シアヌリックスクロライドなどの結合剤を用いて該抗体を担体上に結合せしめてもよい。さらに担体に該抗体を結合せしめるに、該抗体またはそのフラクションを異種動物に同様に皮下注射して得られたh-P T H抗体に対する抗体即ち第二抗体を用いてもよい。即ち上記担体を上述の如

- 12 -

化合物から未反応のノ-34h-P T H( I )-酵素<sup>（標識）</sup>標識化合物を分離すればよく、またこの分離においては通常のB F分離操作が適宜使用されるもので、例えば<sup>（抗体）</sup>抗体を担体上に固定せしめた「固相法」と称す<sup>（担体）</sup>担体を利用する際はその固定化した抗体の固相と未反応のノ-34h-P T H-酵素<sup>（標識）</sup>標識化合物を有する液相とを通常の固液分離手段にて分離するか、「第二抗体法」と称す<sup>（担体）</sup>担体を利用する際は固定化されていないそのまゝの抗体を用いて上述と同様に反応せしめ、これに前述の如くのh-P T H抗体<sup>（抗原）</sup>に<sup>（抗体）</sup>反応する第二抗体を作用せしめて沈澱物を生成し、これを遠心分離等の手段にてノ-34h-P T H( I )-酵素標識化合物とh-P T H抗体さらにその第二抗体とによる沈澱物を分離して、未反応の液相中のノ-34h-P T H-酵素標識化合物と分離してもよく、さらにこの第二抗体法において、上記のh-P T H抗体の固定化の手段を用いて、用いる第二抗体を固定化せしめて、固相法と第二抗体法とを合せた方法として分離してもよい。特に好ましくは、上述

- 14 -

した担体に第二抗体を結合せしめ、これにh-P T H抗体を免疫的反応にて結合せしめたh-P T H抗体を用いてことが最も短時間に反応が完遂し、かつ正確であることより好ましい。

この方法、キットを実施するに当り、試験用セットとして使用するのが好ましく、少なくとも1-34h-P T H(1)-酵素標識化合物の一定量、例えば1テスト当り1-34h-P T Hとし0.1~0.4ng およびh-P T H抗体の一定量、例えば抗体含有血清20000倍希釈<sup>~160000倍希釈</sup>を用いるもので、このキットにさらに別の成分、例えば使用する酵素の活性を測定するための試薬を含んでいてもよい。

#### 試験

このようにして、上記の試験用セットに、対象たる被験者の血清を、必要に応じて希釈して、その定量測定されるべきh-P T H試料として作用せしめ、そのB/F分離して得られる成分のいずれか一方を少なくともその酵素活性にて測定し、それによつて試料中のh-P T H含量を定量し、そのh-P T H含量より甲状腺異常に基くh-P T

- 15 -

。即ち、上記の1-34h-P T H(1)3mgを2mlの0.5%牛血清アルブミン含有50mMリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、2mlづつ分注し、この1-34h-P T H(1)溶液2mlに2mlのFreund's complete Adjuvantを加えてよく混和し、これを2匹の家兎(各々AsI, AsIIとする)に皮下注射(2週間間隔、12回投与)して充分に感作せしめ、その2週間後に採血し、これを3000rpm、15分間遠心してその血清を得、これを60℃、30分間処理した後20℃にて保存し、1-34h-P T HのAsI, AsIIの各々の家兎の抗体を得た。

また、これらの抗体における活性測定は、上記血清を10~31250倍まで希釈した液0.1mlとHunter-Greenwood法による<sup>125</sup>Iによる標識されたh-P T H(以下<sup>125</sup>I-h-P T Hと称す)0.1mlおよび50mMリン酸緩衝液(pH7.5)を用い、また別に同一の系列に1-34h-P T H(1)25mg/mlを加えた系を用いて、40℃、3日間インキュベイトし、デキストラン

- 17 -

Hのホルモンの分泌異常である原発性甲状腺機能亢進症や腎不全などによるカルシウム上昇に基くh-P T Hの異常である続発性甲状腺機能亢進症などの診断を行なうものである。

#### 例

次に、本発明の実施例および参考例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれらによつて何んら限定されるものではない。

#### 実施例

(1) 1-34h-P T H(1)

下記一般式(1)

Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asp-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-NH<sub>2</sub> (1)

で表わされるNH<sub>2</sub>末端1-34h-P T H(1)(Lot No K744206-13、合成品)を用いた。

(2) h-P T H抗体作成

1-34h-P T H(1)を用いて、家兎より公知の方法にて、そのh-P T H抗体を作成した

- 16 -

被覆炭素末(1% Norit A/10mlおよび0.1% Dextran/10mlを混合したもの)0.1mlを添加してB/F分離を行なわせ、その後3000rpm、30分間遠心分離し、次いでその結合されたヨードの放射性活性を測定して、その値をBとして求め、添加した<sup>125</sup>I-h-P T Hの放射性活性値Tとその比率を求める。その結果、横軸を血清の希釈倍数、縦軸をB/Tの比率として図示すれば、第1図に示す通りであり、また図中、○-○はAsIの血清を用いた場合を示し、○---○はAsIの血清に25mg/mlの1-34h-P T Hを添加したものを用いた場合を示し、△-△はAsIIの血清を用いた場合を示し、△---△はAsIIの血清に25mg/mlの1-34h-P T Hを添加したものを用いた場合を示すものであり、その結果、AsIよりの血清の抗体活性は、AsIIよりのそれに比べ2倍程度高いものであつた。

(3) 第二抗体作成

市販品の家兎のIgGを用いて、これを山羊に皮下注射して感作せしめて採血し、遠心分離して

- 18 -

血清を回収し、さらに60℃、30分間処理して、抗家兎IgG抗体(第二抗体)を含む血清を得た。

(4) 1-34h-PTH(1)- $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識化合物

1) N-トリチルアジリールグリシンベンジルエステル(第13回ペプチド討論会第30頁/975年)960mgを100mlの酢酸エチルに溶解し、触媒としてパラジウム-炭素を少量加えて水素気流中室温下30分間処理して接触還元し、次いでこれを濾過し、溶媒を留去した後石油エーテルを加えて洗浄し、減圧乾燥してN-トリチルアジリールグリシン680mg(TLC:溶媒系(クロロホルム:メタノール:酢酸=95:5:1)、シリカゲルプレート(メルカート5721)においてRf=0.19(なお検出はHBr噴霧後ニヒドリン発色せしめた) $\lambda_{max}=260nm$ (エタノール) $E_{260}^{1\%}=27.3$ )を得た(収率88%)。このN-トリチルアジリールグリシン208mg、N-ヒドロキシスクシンイミド74.3mgを、テ

- 19 -

を得た(1.2mg, TLC, Rf=0.49(溶媒系; ブタノール:ピリジン:酢酸:水=15:10:3:12)、なお1-34h-PTHの同一系によるTLCのRf=0.40であつた)。さらに、この0.5mg N-トリチルアジリールグリシン-1-34h-PTH(1)に、0.1mlメチルアルコールおよび0.3mlトリクロル酢酸を加えて0℃、10分間処理してそのトリチル基を脱離せしめ、減圧下でメチルアルコール、トリクロル酢酸を留去し、さらにこれを0.1Mリン酸緩衝液(pH8)5mlに溶解し、この溶液3.5ml(350 $\mu$ g含有)に $\beta$ -ガラクトシダーゼ(シグマ社製)50mgを加えてpH8.5で一夜反応せしめ、次いでセファデックスG-100(1 $\times$ 80cm)を用いるカラムクロマトグラフィによりその酵素活性フラクションを回収し、( $\beta$ -ガラクトシダーゼ)-デヒドロキシセルラーグリシン-1-34h-PTH(1)で表わされる1-34h-PTH(1)- $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識化合物を得た(活性収率84%、結合率62%)。

- 21 -

トラヒドロフラン5mlに溶解し、これにジクロヘキシルカルボジイミド/3.33mgを0℃冷却下に加えて60分間反応せしめ、その後5℃で一夜攪拌し続け、次いでその反応液よりその不溶部(ジクロヘキシルウレア)を吸引濾却し、さらにそのテトラヒドロフランを減圧留去してN-トリチルアジリールグリシン・スクシンイミドエステル250mgを得た(収率91%、TLC, Rf=0.60(溶媒系; クロロホルム:メタノール:酢酸=95:5:1、シリカゲルプレート)。このN-トリチルアジリールグリシン・スクシンイミドエステル0.25mgを0.2mlジメチルホルムアミドに溶解し、また1.7mgの1-34h-PTH(1)を0.1Mペロナール緩衝液(pH9)0.2mlに溶解してこれを加えて一夜攪拌して反応せしめ、次いでセファデックスG-25を充填したカラム(1 $\times$ 120cm)を用いて、0.01M、pH7.2リン酸緩衝液にて展開して55ml~61mlのフラクションを回収し、これを凍結乾燥してN-トリチルアジリールグリシン-1-34h-PTH(1)

- 20 -

2.2'-ジチオビス(ベンゾチアゾール)/3.2gをベンゼン400mlに加え、これに $\beta$ -メルカプトプロピオン酸6gを加えて70℃、3時間加熱攪拌し、その後反応液を氷水浴にて冷却して析出せしめ1.38gの粗結晶を得、さらにこれをベンゼンにて再結晶して1.2gの3-(ベンゾチアゾール-2'-イルジチオ)プロピオン酸の結晶を得た(融点162~164℃、TLC, Rf=0.33(溶媒系; ベンゼン:酢酸エチル=1:2))。この3-(ベンゾチアゾール-2'-イルジチオ)プロピオン酸3gを酢酸エチル20mlに溶解し、これにN-ヒドロキシスクシンイミド1.9gおよびジクロヘキシルカルボジイミド1.7gを加えて3時間、室温中攪拌反応せしめ、生成するジクロヘキシル尿素を濾別し、その後その酢酸エチル層を回収し、さらにこれをリン酸緩衝液(pH7.5)にて洗浄し、次いでこれを<sup>18</sup>Oに脱水せしめて乾固し、さらにこれを熱石油エーテルに溶解した後冷却して3-(ベンゾチアゾール-2'-イルジチオ)プロピオン酸・スクシンイミドエ

- 22 -



ステル 2.4 g の結晶を得た〔融点  $114 \sim 115^{\circ}\text{C}$ 、TLC、 $R_f = 0.53$  (溶媒系; ベンゼン: 酢酸エチル = 3:1)〕。この 3- (ベンゾチアゾール-2'-イルジチオ) プロピオン酸・スクシンイミドエステル 0.2 g を 0.1 ml ジメチルホルムアミドに溶解し、これを、1-34 h-PTH (I) 2.0 mg を 0.1 M ペロナール緩衝液 (pH 7.5) 0.2 ml に溶解して溶液に加えて室温下 3 時間攪拌せしめ、次いでこれをセフアデックス G-25 を充填したカラム ( $1 \times 75 \text{ cm}$ ) を用いてその活性フラクションを回収して凍結乾燥し 3- (ベンゾチアゾール-2'-イルジチオ) プロピオン酸・1-34 h-PTH (I) 1.7 mg を得、これを 1.0 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、その 0.01 ml を分取し、これに 2.5 mg  $\beta$ -ガラクトシダーゼ含有リン酸緩衝液 (pH 7.5) 5 ml の溶液を加えて室温下、1 時間反応せしめ、次いでセフアデックス G-100 ( $1 \times 80 \text{ cm}$ ) を用いるカラムクロマトグラフィーにより、その酵素活性フラクションを回収し、 $\beta$ -ガラクトシダー

- 23 -

抗原抗体反応用緩衝液として 0.1%  $\text{NaN}_3$ 、3 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.15 M  $\text{NaCl}$ 、0.25% 牛血清アルブミンを含有する 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定用緩衝液として 0.1%  $\text{NaN}_3$ 、0.15 M  $\text{NaCl}$ 、0.1% 牛血清アルブミン含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、発色用緩衝液として 0.1 M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 10.4) を用いた。

上記の各成分を組合せて、50 テスト用 h-PTH 測定用キットとした。

(6) 上記のキットにおける、1-34 h-PTH (I) の抗体 100  $\mu\text{L}$ 、1-34-PTH (I)- $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識化合物 100  $\mu\text{L}$ 、抗原抗体反応用緩衝液 200  $\mu\text{L}$  を 5 $^{\circ}\text{C}$ 、一夜反応せしめ、次いでこれに第二抗体 100  $\mu\text{L}$ 、正常血清 100  $\mu\text{L}$  を加えて 5 $^{\circ}\text{C}$ 、一夜反応せしめた後 3000 rpm、15 分間遠心分離せし、さらに抗原抗体反応用緩衝液で 2 回洗浄した後、これに基質溶液 100  $\mu\text{L}$ 、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定用緩衝液 200  $\mu\text{L}$  加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 分

- 25 -

特開昭55-26477(7)

ゼの SH 基と 1-34 h-PTH (I) の  $\text{NH}_2$  基とを 3-チオプロピオン基にて架橋結合せしめた 1-34 h-PTH- $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識化合物を得た (活性収率 78%、結合率 92%)。

(5) 上記の家兎による 1-34 h-PTH (I) の抗体を 0.25% 牛血清アルブミン、0.15 M 塩化ナトリウムを含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 5000 倍希釈した溶液 1 ml を凍結乾燥し、用時 5 ml 溶液として 50 テスト用とする。

また上記の山羊よりの第二抗体の血清 0.6 ml を凍結乾燥して、用時 5 ml 溶液として 50 テスト用とする。

家兎の正常血清 2.5  $\mu\text{L}$  を凍結乾燥して、用時 5 ml 溶液として 50 テスト用とする。

さらに、上記の 1-34 h-PTH (I)- $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識化合物を 1-34 h-PTH (I) 5 r/ml 含有の溶液に調整し、これを 500 倍溶液となし、その 5 ml を用いて 50 テスト用とする。

- 24 -

間反応せしめ、次いでこれに発色用緩衝液 2.5 ml を加えて反応終了、および発色せしめて、これを 420 nm の波長にてその吸光度を測定した。その結果、横軸に 1-34 h-PTH 濃度 (0.025 ~ 6.4 mg) 縦軸に 1-34 h-PTH 無添加に於ける酵素活性を 100% とした時の相対活性を取った場合の検量線は第 2 図に示す通りであつて、極めて良好に測定し得たものであつた。

(7) 上記の方法に基いて腎不全患者の血清を 1-34 h-PTH を抗原として作成した抗体等を用いて測定し、かつ従来法による 1-84 h-PTH のを用いてなる測定値とを比較すれば次の通りである。

1-34 h-PTH 抗体 を用いた場合の h-PTH 値	1-84 h-PTH 抗体 を用いた場合の h-PTH 値
0.125 ng/ml 以下	1.65 ng/ml
0.38 ng/ml	2.3 ng/ml
0.125 ng/ml 以下	3.6 ng/ml
0.66 ng/ml	2.7 ng/ml
0.40 ng/ml	1.85 ng/ml

- 26 -

0.125 ng/ml 以下	1.47 ng/ml
0.26 ng/ml	1.55 ng/ml
0.27 ng/ml	1.90 ng/ml
0.125 ng/ml	1.05 ng/ml
0.47 ng/ml	0.8 ng/ml

その結果、1-34h-PTH(1)- $\beta$ -ガラクトシダーゼ標識化合物および1-34h-PTH(1)抗体を用いる本発明は、生物活性を有するh-PTHに対し良好な相関性を示す極めて良好な診断結果を与えたものであつた。

#### 4. 図面の簡単な説明

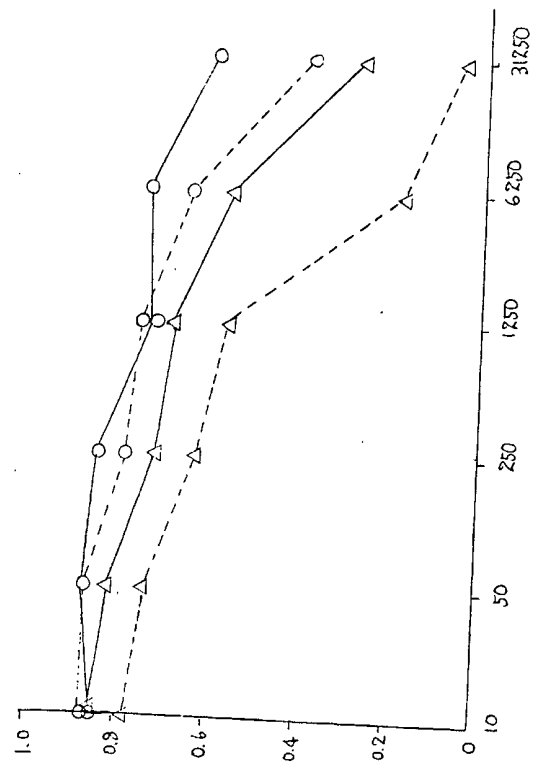
第1図は1-34h-PTH(1)の家兎の抗体の活性の特性を示し、第2図は1-34h-PTH(1)の検量線を示す。

特許出願人 東洋醸造株式会社

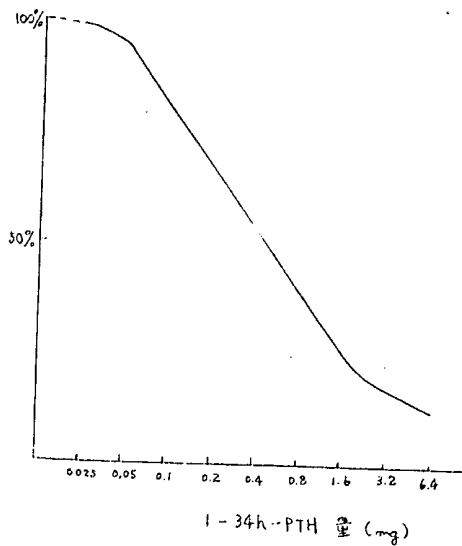
代表者 小川三男

- 27 -

第1図



第2図



手続補正書

昭和54年9月5日

特許庁長官 川原能雄殿

#### 1. 事件の表示

昭和53年特許願第100155号

#### 2. 発明の名称

h-PTH測定法およびその測定用キット

#### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三権632の1

名称 東洋醸造株式会社

新代表者 伊東富士

(旧代表者 小川三男)

#### 4. 補正命令の日付

自 発

#### 5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

#### 6. 補正の内容

明細書第6頁第2行目の「(Enzyme-immunoassay)」を「(Enzyme-immunoassay)」と訂正する。

明細書第15頁第19行目の「定置し、」を  
「定置するものである、次いで定置された」と訂  
正する。

明細書第16頁第4行目の「行なりものである  
。」を「行なりものであつて、有用に利用される  
。」と訂正する。

明細書第25頁第2行目および5行目の「0.1  
5 M NaCl」を訂正する。

明細書第25頁第14行目の「200  $\mu$  L」の  
後に「および検液100  $\mu$  L (1-34 n-  
PTH 0.025 ~ 6.4 ng)」を加入する。